

MARCO AURÉLIO BIANCHINI

**OSTEOPROMOÇÃO ATRAVÉS DO USO COMBINADO DE
PARAFUSOS DE OSSO BOVINO E MEMBRANAS REFORÇADAS
COM TITÂNIO. ANÁLISES CLÍNICA E HISTOLÓGICA**

Florianópolis
2006

MARCO AURÉLIO BIANCHINI

**OSTEOPROMOÇÃO ATRAVÉS DO USO COMBINADO DE
PARAFUSOS DE OSSO BOVINO E MEMBRANAS REFORÇADAS
COM TITÂNIO. ANÁLISES CLÍNICA E HISTOLÓGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Florianópolis
2006

MARCO AURÉLIO BIANCHINI

**OSTEOPROMOÇÃO ATRAVÉS DO USO COMBINADO DE
PARAFUSOS DE OSSO BOVINO E MEMBRANAS REFORÇADAS
COM TITÂNIO. ANÁLISES CLÍNICA E HISTOLÓGICA**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO IMPLANTODONTIA e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 09 de março de 2006

Prof. Dr. Ricardo de Souza Vieira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador

Profa. Dra. Maria José de Carvalho Rocha
Membro

Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso
Membro

Prof. Dr. Antônio Vicente de Souza Pinto
Membro

Prof. Dr. Hugo Nary Filho
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu irmão **Baique**, “*in
memorian*”, que foi meu primeiro paciente na
implantodontia e grande incentivador da profissão.

AGRADECIMENTOS

*A **Deus**, que na pessoa de Jesus Cristo me deu o dom da vida.*

*A minha mulher **Evelyn**, por todo o seu amor e companheirismo.*

*Aos meus filhos, **Luiz Felipe** e **Luísa**, pela alegria que me transmitem.*

*Aos meus pais **Ivo** e **Ruth**, pelos valores que me passaram.*

*As minhas irmãs-mãe (**Lainha** e **Kátia**) e aos meus irmãos-pai (**Baique**, **Ivinho** e **Nando**), por me tratarem sempre como um filho.*

*A minha sogra **Helô**, pela amizade, carinho e correção do português.*

*Ao meu sogro **Ciro**, pela amizade e confiança em mim depositadas.*

*A todos os **amigos** do futebol, samba e festas, pelas lições de amizade.*

*Aos funcionários do CEPID (**Dolores**, **Gisella** e **Mirian**), pela dedicação e carinho com que trabalham.*

*À **Universidade Federal de Santa Catarina** (professores, funcionários e alunos), por terem me proporcionado esta oportunidade.*

*Ao professor **Telmo Tavares**, pelo grande auxílio prestado na análise histológica.*

*Ao **Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC**, pela usinagem dos parafusos.*

*Aos professores **Vinícius** e **Gláucia**, pelo auxílio na disciplina de Periodontia.*

A Disciplina de Endodontia da UFSC, pelo uso do seu laboratório.

*A USP de Bauru, pelos processamentos e análises histológicas, em especial aos professores **Ricardo Marins** e **Vanessa Soares Lara**.*

*A todos os parceiros da Clínica Odontológica Sorridente, pelo apoio constante, em especial a **Vera**, pelo auxílio nos trabalhos práticos.*

*Ao veterinário **Geraldo Bernardes**, pela dedicação e atenção dispensada aos animais.*

*A professora **Cristina Mizusaki** (in memorian), pelo apoio na idealização do projeto.*

*A todos os antigos e atuais **colegas de Pós-graduação**, especialmente ao **Pontual**, ao **Leonardo**, e ao **César**, pela colaboração nesta pesquisa.*

Aos membros da banca:

- Prof. **Ricardo de Souza Magini**, meu orientador, não só na parte científica, como também na escola da vida. Obrigado, meu irmão!*
- Prof. **Antônio Carlos Cardoso**, meu conselheiro e amigo em Cristo. Valeu a parceria, meu mestre!*
- Prof.^a. **Maria José de Carvalho Rocha**, por ser minha fonte de inspiração na vida acadêmica e sinônimo de lealdade. Zezé, você é nossa rocha!*
- Prof. **Sérgio Fernando Torres de Freitas**, pela imensa disposição em nos atender sempre.*
- Prof. **Antônio Vicente de Souza Pinto**, pelo pioneirismo, alegria e empolgação com que trabalha na implantodontia.*
- Prof. **Hugo Nary Filho**, pelas freqüentes demonstrações de humildade, mesmo com tanto conhecimento científico adquirido.*

A todos que participaram direta ou indiretamente desta pesquisa e porventura não tiveram seus nomes mencionados, o meu imenso agradecimento.

BIANCHINI, Marco Aurélio. **Osteopromoção através do uso combinado de parafusos de osso bovino e membranas reforçadas com titânio: análises clínica e histológica.** 2006. 52f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Proposição: avaliar clínica e histologicamente a influência dos parafusos de osso bovino associados às membranas reforçadas com titânio na osteopromoção. Material e Métodos: utilizou-se um modelo animal com 18 cães beagle. Cada animal recebeu 8 parafusos instalados na tíbia direita, sendo que 4 ficaram isolados e 4 foram recobertos por uma membrana reforçada com titânio. Os cães foram divididos em 3 grupos de 6 animais e avaliados após 2, 4 e 6 meses. Durante esse período os animais receberam marcadores ósseos para fluorescência (alizarina, calceína e tetraciclina). Nenhuma membrana ou parafuso de osso teve exposição precoce. Três animais foram descartados devido à fratura prematura da tíbia. As amostras foram processadas através da técnica da hematoxilina e eosina (HE). Foi realizada uma análise qualitativa das lâminas em HE e uma outra, através de escores pré-estabelecidos, quanto à presença ou não de marcadores. Clinicamente os espécimes tiveram os ganhos ósseos mensurados através de um paquímetro. Resultados: a análise qualitativa em HE demonstrou haver a presença de novo osso nas áreas enxertadas. Os escores obtidos foram submetidos a um teste de Kruskal-Wallis e demonstraram não haver diferença estatística entre os grupos. As observações clínicas relataram um ganho ósseo vertical médio de 5,15mm. Discussão: os parafusos absorvíveis de osso cortical bovino têm um comportamento tecidual biocompatível estimulando o crescimento ósseo. Conclusão: os resultados sugerem que os parafusos de osso cortical bovino podem ser utilizados em associação com as membranas reforçadas com titânio, melhorando a osteopromoção.

Palavras-chave: Parafusos ósseos. Regeneração óssea. Implantes dentários.

BIANCHINI, Marco Aurélio. **Osteopromoção através do uso combinado de parafusos de osso bovino e membranas reforçadas com titânio: análises clínica e histológica.** 2006. 52f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Purpose: the goal of this investigation was to evaluate the clinical and histological influences of the bovine bone screws associated with the titanium reinforced membranes in bone promotion. Materials and Methods: an animal sample of 18 dogs from the Beagle breed was used. Each animal received 8 screws placed in the right tibias. Four of the screws were isolated and the other 4 were covered with a titanium reinforced membrane. The dogs were divided in 3 groups of 6 dogs and evaluated after 2, 4 and 6 months. During this period the animals received fluorescent bone markers (alizarin, calceine and tetracycline). Neither the membrane nor the screws had precocious exposition. Three animals were discarded due to premature tibia fracture. The samples were processed through the hematoxiline and eosin (HE) technique. Qualitative analysis was made in a HE blade and in another one, through the scores established according to the presence of markers or not. Clinically the animals had bone gain measured by a pachymeter. Results: the qualitative analyses in HE showed the presence of new bone in the grafted area. The obtained scores were submitted to the Kruskal-Wallis test and showed no statistical differences between the two groups. The clinical observations reported an average vertical bone gain of 5,15mm. Discussion: the absorbable bovine cortical bone screws have a biocompatible tissue behavior which stimulates bone grew. Conclusion: the results suggest that the bovine cortical bone screws can be used in association with the titanium reinforced membranes improving bone promotion.

Key word: Bone screws. Bone regeneration. Dental implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parafuso de osso bovino obtido por usinagem preconizado por Oliveira (2004), usado nesta pesquisa.....	18
Figura 2 - Experimentos realizados na tíbia dos cães - observar os parafusos sem membrana e os parafusos com cobertura de membrana.	21
Figura 3 – Segunda etapa cirúrgica: observar os parafusos de osso recobertos por membrana (volume maior) e parafusos de osso sem membrana, indicados pela sonda milimetrada.....	24
Figura 4 - Ausência de volume tridimensional uniforme para avaliação macroscópica do grupo dos parafusos sem membrana: observar os parafusos já em processo de reabsorção, após 4 meses e em contato íntimo com o osso neoformado.....	28
Figura 5 - Medida da altura do ganho ósseo no grupo dos parafusos recobertos com membrana: observar a presença volumosa de tecido ósseo em neoformação ao redor dos parafusos, após 4 meses.....	28
Figura. 6 e 7 - HE do grupo dos parafusos de osso com membrana, após 2 meses. Observar a união dos dois tipos ósseos, com a presença de osteócitos e espaços medulares.....	31
Figura. 8 e 9 - Grupo dos parafusos de osso com membrana após 2 meses. Presença de 2 marcadores fluorocromáticos (tetraciclina laranja e calceína verde), tanto na superfície do osso neoformado como no parafuso de osso.	32
Figura 10 e 11 - HE do grupo dos parafusos de osso com membrana após 4 meses. Observar a organização do tecido ósseo neoformado em íntimo contato com o osso do parafuso.	33
Figura12 e 13 - Grupo dos parafusos de osso sem membrana após 4 meses. Presença dos marcadores fluorocromáticos (tetraciclina laranja e calceína verde), nas duas superfícies. Observar a dificuldade de identificação da interface.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1	OBTENÇÃO DOS PARAFUSOS DE OSSO BOVINO	17
2.2	ROG.....	18
2.3	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	19
2.4	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	19
2.4.1	Primeira etapa cirúrgica.....	19
2.4.2	Aplicação dos marcadores ósseos para fluorescência	22
2.4.3	Segunda etapa cirúrgica.....	23
2.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA	24
2.5.1	Análise histológica qualitativa em HE.....	25
2.5.2	Análise histológica no microscópio de fluorescência.....	25
2.6	ANÁLISE CLÍNICA	27
3	RESULTADOS	29
3.1	RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA EM HE	29
3.2	RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA POR FLUORESCÊNCIA	30
3.3	RESULTADOS DA ANÁLISE CLÍNICA	36
4	DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A quantidade óssea insuficiente nos sítios que irão receber implantes osseointegrados tornou-se um dos principais problemas enfrentados pelos implantodontistas. Associada à etapa protética, a disponibilidade de osso é um pré-requisito fundamental para que o implante seja colocado em uma posição correta e a prótese possa ser confeccionada de maneira adequada. As situações clínicas que não oferecem essa disponibilidade óssea, freqüentemente são submetidas a procedimentos de enxertos ósseos. A reconstituição óssea objetiva a recuperação da forma e da função de tecidos ósseos defeituosos. Os materiais mais utilizados na reconstituição são os enxertos ósseos, os quais podem servir para suportar o potencial inerente do osso para se reparar ou, pelo menos, para manter o tecido no local de enxertia através dos processos de osteoindução e osteocondução¹.

Enxertos de osso autógeno, substitutos de enxertos ósseos alógenos e xenógenos, osteopromoção através do uso de membranas e distração osteogênica são algumas das várias técnicas para o aumento do volume ósseo que vêm sendo desenvolvidas e utilizadas dentro da implantodontia. A maioria dessas técnicas requer uma área doadora considerável ou a presença de doadores específicos. Dependendo da quantidade necessária de osso, uma cirurgia desse tipo teria a sua morbidade extremamente aumentada, dificultando ou até mesmo contraindicando o procedimento.

Dentre todos os materiais xenógenos, o osso bovino é o mais utilizado. Esse material pode ser encontrado na forma de osso bovino mineral proteinizado ou osso bovino mineral desproteinizado (OBMD). Ambos mostram-se com propriedades especialmente favoráveis, devido à sua estrutura natural, que é comparável, física e quimicamente, à matriz óssea mineralizada humana². Suas partículas são bem integradas ao osso regenerado do hospedeiro, isto é, o material está em contato direto com o novo osso, não apresenta reação imunológica e, depois, sofre processo de reabsorção osteoclástica^{3,4}. Trata-se de carbonato apatita⁵, naturalmente poroso, 100% cristalino² e com módulo de elasticidade similar ao osso natural, descrito como hidroxiapatita derivada do boi⁶. Devido à sua estrutura natural, é comparável física e quimicamente à matriz óssea mineralizada humana^{2,7-16}. Em 2004¹⁷ realizou-se uma revisão de literatura procurando comparar os enxertos de osso autógeno com os enxertos xenógenos. Os autores concluíram que os enxertos de osso autógeno são considerados osteogênicos, osteocondutores e osteoindutores, enquanto os xenógenos, graças às suas propriedades físico-químicas, semelhantes às do osso humano, possuem grande potencial osteocondutor.

Embora a possibilidade de transmissão de doenças seja bastante remota e atinja somente o osso bovino mineral proteinizado, existe atualmente uma preocupação especial com a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) ou doença da “vaca louca”. Apesar de a literatura não relatar nenhum caso de transmissão dessa doença através da utilização de material derivado de osso bovino, alguns cuidados devem ser executados para se eliminar completamente o risco. Os animais devem ser selecionados de rebanhos não expostos a EEB desde 1980, e sem evidências de alimentação com carne infectada ou alimentação com ossos, dando preferência à alimentação à base de matéria verde (pasto)⁴.

Por outro lado, o efeito da utilização de OBMD para aumento vertical ainda é bastante controverso. Em 2001, um estudo¹⁸ avaliou a formação óssea lateral na mandíbula de ratos.

Após a perfuração da cortical óssea da mandíbula, um dispositivo de exclusão óssea rígido e não poroso foi adaptado. Essas abóbodas foram preenchidas com OBMD e sangue do próprio animal. Os resultados histométricos mostraram que a percentagem de formação óssea nos grupos controle aumentou em 31%, enquanto no grupo onde foi utilizado OBMD esse aumento foi de 8,1%. As observações histológicas descreveram que a maioria das partículas desse material ficaram envoltas de tecido conjuntivo fibroso. A conclusão do estudo relatou que o OBMD falhou em promover a formação óssea lateral da mandíbula de ratos por meio de ROG, demonstrando a imensa dificuldade de se obter aumento ósseo vertical¹⁸. Essas conclusões vão ao encontro dos achados de outros autores^{19,20}, que apontam o aumento ósseo vertical como o maior desafio em termos de reconstrução óssea.

A osteopromoção através da Regeneração Óssea Guiada (ROG) também vem sendo realizada como um recurso para o aumento do volume ósseo. Vários materiais absorvíveis e não absorvíveis têm sido usados como membranas. As membranas, rígidas ou com reforço de titânio, são capazes de promover a formação de quantidade significativa de novo osso e manter espaço suficiente, sem a adição de material de preenchimento. Isso ocorre devido à sua capacidade de “efeito tenda”, principalmente quando fixadas com pequenos parafusos metálicos, pois o maior problema das membranas sem reforço de titânio, sejam elas absorvíveis ou não, é a manutenção do espaço para a neoformação óssea²¹⁻²³.

Em um estudo clínico²⁴, 5 pacientes receberam 15 implantes cônicos do tipo Branemark em 6 diferentes áreas que necessitavam de aumento ósseo vertical. Os implantes foram inseridos deixando-se uma exposição supracristal de 4mm a 7mm (média de 4,67mm). Os objetivos desse estudo foram: a) avaliar um protocolo de aumento ósseo vertical utilizando membranas reforçadas com titânio e b) avaliar a interface entre o implante e o novo osso oriundo da regeneração, através da inserção de mini-parafusos de titânio (1.3 x 10mm) que foram posicionados distalmente aos implantes, com uma exposição supra-cristal de 3mm a

4mm. Tanto os implantes como os mini-parafusos foram cobertos por uma membrana reforçada por titânio. As membranas foram removidas após 9 meses de cicatrização. As medidas das biópsias dos espécimes demonstraram um ganho ósseo de 3mm a 4mm e a análise histológica mostrou que todos os mini-parafusos estavam em contato direto com o novo osso. Os resultados sugeriram que inserir implantes com necessidade de ganho vertical de 3mm a 4mm pode ser previsível através do uso de membranas reforçadas com titânio e que o novo osso formado é capaz de integrar-se ao implante após 9 meses²⁴.

Investigou-se²⁵ o aumento lateral de rebordo, utilizando enxerto de osso autógeno proveniente do mento e da região retromolar, ambos recobertos por membranas. Foram tratados 40 pacientes e observou-se a ausência de sinais clínicos de reabsorção dos enxertos. Destaques foram dados à técnica de incisão distante da área cirúrgica, perfuração da cortical, colocação estável do enxerto autógeno, adaptação e estabilização precisas (com miniparafusos) das membranas de e-PTFE e uma sutura livre de tensão. Após 7 a 13 meses, os sítios foram reabertos para a remoção da membrana e o implante foi colocado. Aproximadamente 38 de 40 pacientes exibiram um excelente aumento de rebordo, com dois sítios apresentando algum encapsulamento de tecido mole do osso enxertado.

Um grupo de autores²⁶ tentou identificar os limites do aumento vertical procurando demonstrar que seria possível obter-se um aumento vertical maior do que 4mm em rebordos com deficiência de altura óssea. Seis pacientes saudáveis foram selecionados e tratados, com 15 fixações do sistema Branemark, que tiveram uma exposição de roscas de 3,7mm de altura. As áreas expostas foram recobertas com osso autógeno proveniente do coletor ósseo e uma membrana reforçada com titânio. Apenas uma das membranas apresentou exposição precoce, sendo imediatamente removida. Após 12 meses, as demais membranas foram removidas, juntamente com a cirurgia de segundo estágio. Dos cinco casos restantes, todos apresentaram as roscas dos implantes recobertas por tecido regenerativo. Biópsia foi removida dessas

regiões, apresentando os seguintes resultados: Em um caso houve preenchimento ósseo superior a sete mm de altura óssea. Em três casos todo o espaço foi preenchido com mais de 5mm de altura óssea. Em um caso a parte mais coronal do enxerto (cerca de 1mm) foi preenchida com tecido conjuntivo e o restante foi preenchido por osso. Os resultados demonstraram uma média de 4,95mm de ganho ósseo vertical.

Na mesma linha de pesquisa, dois autores²⁷ realizaram um estudo retrospectivo para avaliar a previsibilidade de se obter ganho ósseo vertical ao redor de implantes, seguindo estritamente um protocolo cirúrgico. 48 implantes foram inseridos em 14 pacientes parcialmente desdentados e em 4 desdentados totalmente. Os implantes foram inseridos deixando-se de 2mm a 7mm de roscas expostas. Essas roscas foram recobertas por fragmentos de osso autógeno removido das áreas adjacentes, bem como de osso proveniente do coletor ósseo. Todas as áreas enxertadas foram recobertas por membranas. Três das 22 membranas utilizadas tiveram exposição precoce e foram imediatamente removidas. As 19 membranas remanescentes permaneceram no local durante os 12 meses de cicatrização e após esse período houve a formação de tecido regenerativo sobre as roscas expostas. Em 8 casos realizou-se a biópsia histológica, que demonstrou a presença de osso vital nas áreas enxertadas. Em 3 casos a parte mais coronal do enxerto (cerca de 1mm) foi preenchida por tecido conjuntivo, sendo que no restante da área houve completa formação óssea. Os autores concluíram, através desse estudo retrospectivo, que, quando um protocolo cirúrgico é seguido, a possibilidade de complicações cirúrgicas é reduzida e a previsibilidade dessa técnica é confirmada.

Outros autores²⁸ compararam o uso de membranas com reforço de titânio para ROG ao redor do implante dental sem o uso de enxertos ósseos propriamente ditos, exceto um preenchimento cuidadoso do espaço, com coágulo sanguíneo, através da perfuração da superfície do osso, com enxertos autógenos e alógenos. Os autores obtiveram um aumento

vertical que variava de 1,35mm até 1,87mm e concluíram que a formação de osso acima da crista é previsível se usada uma membrana reforçada com titânio e material de preenchimento ósseo.

Verificar a qualidade óssea do novo osso formado através da ROG também tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores. Um grupo de autores²⁹ desenvolveu uma análise histológica do osso formado através da ROG sobre roscas expostas de implantes. 30 implantes foram inseridos, sendo que seis deles foram propositalmente removidos após 12 meses de cicatrização da ROG. Os resultados indicaram uma estabilidade clínica em todos os implantes colocados. Entretanto, a histomorfometria demonstrou haver um menor contato entre o metal da área exposta que recebeu a ROG (43,2%) comparado com o metal da área que não recebeu ROG (60,3%). Por outro lado, outros autores³⁰ realizaram um estudo prospectivo clínico, avaliando, em 5 anos, 66 implantes que receberam ROG. Os resultados tiveram uma taxa de sucesso de 98,3% e os autores concluíram que os resultados clínicos de implantes que receberam enxertos ósseos através da ROG são comparáveis àqueles que não receberam técnicas de regeneração óssea.

Observando as inúmeras vantagens do osso bovino, pesquisadores do Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), vinculado ao Departamento de Estomatologia no Centro de Ciências da Saúde e do Laboratório de Usinagem e Comando Numérico (USICON), vinculado ao Departamento de Engenharia Mecânica no Centro Tecnológico, ambos lotados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), vêm tentando desenvolver parafusos de osso como material de fixação e preenchimento^{1, 31-34}.

Sendo assim, o presente estudo visa a avaliar clínica e histologicamente a influência dos parafusos de osso bovino associados às membranas reforçadas com titânio na osteopromoção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS PARAFUSOS DE OSSO BOVINO

O osso bovino utilizado é proveniente da divisão de Biomateriais da Baumer S.A. (São Paulo-Brasil), empresa produtora de materiais para enxertos. Os animais doadores são de uma mesma raça, sexo e idade e originários do rebanho da própria empresa, que os cria com alimentação à base de matéria verde (pasto) e ração obtida de fornecedor, cujo credenciamento se baseia na qualidade de carne tipo exportação. O processo de abate corte e embalagem da carne está de acordo com as normas sanitárias nacionais estabelecidas por órgãos competentes, como Vigilância Sanitária e Ministério da Saúde, de acordo com as exigências internacionais. Os ossos inicialmente foram submetidos à remoção de resíduos de músculos, vasos sanguíneos e linfáticos, tendões, gordura e, finalmente, à liofilização.

Para a usinagem dos parafusos ósseos experimentais, foi utilizado osso cortical bovino desproteínizado, de onde foram usinados cerca de 200 parafusos cônicos. Esses parafusos foram testados quanto à sua resistência a forças de torção. Essa etapa de produção experimental dos parafusos foi realizada no USICON. Durante a usinagem dos parafusos cônicos, foram observados os parâmetros utilizados na confecção dos parafusos cilíndricos referidos em trabalhos anteriores^{1,34}. Os parafusos sugeridos no presente estudo tiveram como

referência as dimensões (diâmetro e comprimento) dos implantes bucais do tipo Osseotite NT MicroMini de 3,25mm x 8,5mm da marca 3i (Implant Inovation – Flórida – USA), sendo confeccionados com as dimensões que aparecem na FIG. 1.

- cabeça de 4,0mm x 4,0mm
- comprimento da cabeça de 5,0mm
- comprimento da rosca cônica trapezoidal de 5,0mm
- maior diâmetro da rosca cônica trapezoidal de 3,0mm
- menor diâmetro da rosca cônica trapezoidal de 2,0mm
- passo de rosca de 0,8mm
- comprimento total de 10,0mm



Figura 1 - Parafuso de osso bovino obtido por usinagem preconizado por Oliveira (2004), usado nesta pesquisa.

2.2 ROG

Foram utilizadas 18 membranas de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) com reforço de titânio, tamanho extra-grande 9Y da marca GORE-TEX® (Copyright© W.L. Gore & Associates, Inc, DE-USA), nos procedimentos cirúrgicos.

2.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Participaram deste estudo 18 cães da raça Beagle (Canis Familiares), fêmeas e jovens, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os cães apresentavam um bom estado de saúde, estando todos devidamente supervisionados pela equipe do Biotério Central da UFSC. A liberação dos animais se deu após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº 244/CEUA.

2.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

2.4.1 Primeira etapa cirúrgica

Os 18 cães receberam os mesmos procedimentos cirúrgicos que foram realizados na tíbia dos animais. Esses procedimentos foram executados no laboratório da Disciplina de Endodontia da UFSC. Foram eles: a) membranas de politetrafluoretileno expandido reforçadas com titânio 9Y GORE-TEX® (Copyright© W.L. Gore & Associates, Inc, DE - USA), recobrando 4 parafusos de osso bovino e b) 4 parafusos de osso bovino sem cobertura de membrana.(FIG. 2).

Como profilaxia antibiótica, duas horas antes de cada cirurgia foi administrada, intramuscularmente, uma dose de antibiótico de 40.000U. por quilo de peso do animal (Pentabiótico® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., São Paulo - Brasil).

A anestesia geral foi induzida pela administração intravenosa de tiopental sódico (Thionembutal® - Abbot Laboratories North Chicago – Illinois, USA.), na dose de 1,0ml/kg e complementada com anestesia local (xilocaína a 2% - Merrel – Lepetit Farmacêutica Ltda, São Paulo - Brasil). Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os cães foram sedados com cloridrato de dihidrotiazina, intramuscular (Rompum® - Bayer S.A. – Saúde Animal, São Paulo - Brasil), na dose de 1,5ml/10Kg, visando o relaxamento muscular generalizado do animal e otimizando o efeito da anestesia geral.

Através de uma incisão horizontal na tíbia dos cães, realizou-se o acesso cirúrgico ao tecido ósseo. Os experimentos ficaram separados entre si por uma distância de aproximadamente 1cm e foram descorticalizados através de perfurações com uma ponta esférica nº 8.

Para a inserção dos parafusos de osso bovino adotou-se uma sequência semelhante à inserção de um implante osseointegrado. As perfurações iniciais foram executadas com uma fresa tipo lança. Com a ponta *twist drill* de 2,0mm de diâmetro, levou-se a perfuração até 8,5mm de profundidade. Essas duas fresas iniciais fazem parte do Kit Cirúrgico para colocação de implantes do Sistema Neodent. (Neodent® - Paraná - Brasil). Foram levadas a efeito perfurações, executadas em alta velocidade (1600rpm).

Na etapa subsequente, foi utilizada uma ponta cônica para implantes Osseotite NT MicroMini de 3,25mm x 8,5mm, da marca 3i (Implant Inovation – Flórida – USA), para dar forma cônica à perfuração, também sob alta velocidade (1600rpm). Na confecção das roscas, foi empregado macho de rosca para implantes Osseotite NT MicroMini, de 3,25mm x 8,5mm,

da marca 3i . Após essa seqüência de fresas, foram inseridos os parafusos ósseos usinados, através do aparafusamento manual, até ser alcançada a estabilidade primária, utilizando-se, para isso, uma catraca do sistema Nobel biocare (Nobel biocare® - Gottemburg - Suécia)

Para a colocação das membranas reforçadas com titânio sobre os parafusos de osso bovino, foram utilizados parafusos metálicos para fixação de membranas da marca Neodent (Neodent® - Paraná - Brasil).

Após a conclusão de todos os procedimentos cirúrgicos, os tecidos foram coaptados e uma sutura em camadas foi realizada até o fechamento completo da ferida. O fio de sutura utilizado nas áreas internas foi Vicryl reabsorvível 4.0 (Ethicon-Vicryl®Johnson&Johnson– São Paulo-Brasil) e, na área externa, o fio de nylon 4.0 (Somerville® - Pernambuco –Brasil).

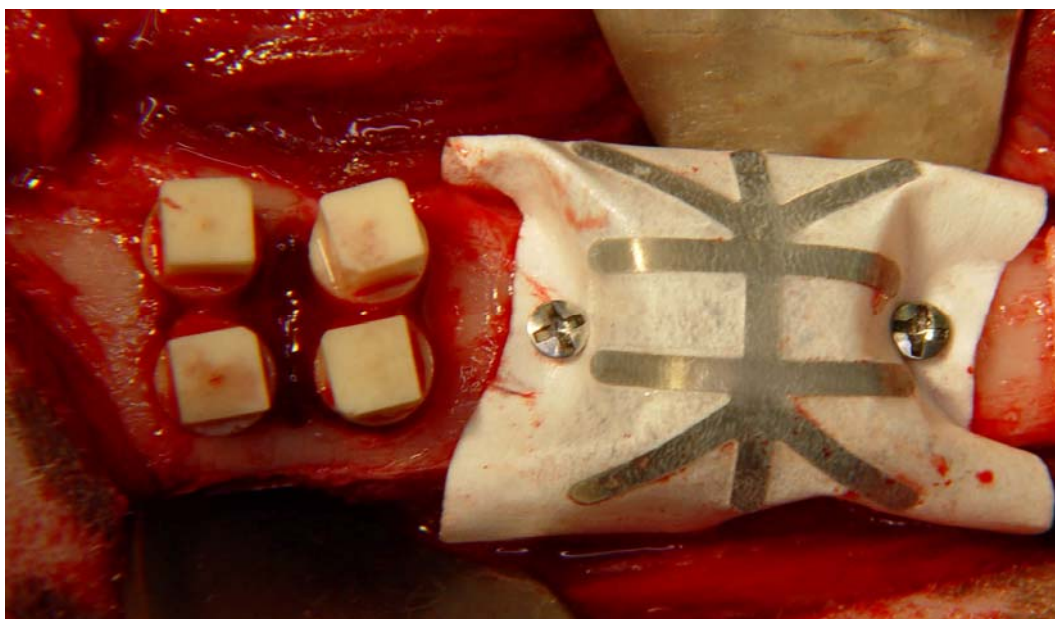


Figura 2 - Experimentos realizados na tíbia dos cães - observar os parafusos sem membrana e os parafusos com cobertura de membrana.

Logo após a cirurgia, os cães foram agasalhados com um cobertor de lã para manter a temperatura corporal, sendo acompanhados até o fim do efeito anestésico. Cessado o efeito anestésico os animais foram transferidos para as suas respectivas baias, no Biotério Central da UFSC, onde foram vistoriados diariamente até o término da pesquisa. Ao longo dos sete dias subsequentes à cirurgia, os animais receberam um agente analgésico e antiinflamatório, administrado via intramuscular na dose de 0,14ml/kg (Banamine® Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro - Brasil), com o objetivo de controlar a dor e o edema da área operada. Durante todo o período pós-operatório, não foram observadas complicações cirúrgicas em 15 animais. Nenhuma membrana ou parafuso de osso foi exposto precocemente. Da amostra inicial de 18 cães, 3 tiveram de ser descartados devido à fratura precoce da tíbia antes da remoção das amostras.

2.4.2 Aplicação dos marcadores ósseos para fluorescência

Durante o período pós-operatório dos animais, foram aplicados marcadores ósseos que atuam sobre a apatita óssea, evidenciando-se os períodos de deposição do novo osso³⁵. Para uma interpretação morfológica, foram administrados diferentes corantes em diferentes períodos de tempo³⁶. A formulação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores são apresentados no QUADRO 1. Esses marcadores foram aplicados em períodos pré-estabelecidos, sendo injetados na região subcutânea, associados à solução tampão de Na_2HPO_4 (Sódio Fosfato Dibásico).

TEMPO	SUBSTÂNCIA	DOSE	INJEÇÃO (mg/kg)
14 Dias	Alizarina*	30mg/kg	3g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
21 Dias	Alizarina*	30mg/kg	3g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
28 Dias	Calceína**	10mg/kg	1g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
35 Dias	Calceína**	10mg/kg	1g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
42 Dias	Tetraciclina***	60mg/kg	6g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
49 Dias	Tetraciclina***	60mg/kg	6g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄

* Labsynth produtos para laboratórios LTDA, São Paulo - Brasil

** Labsynth produtos para laboratórios LTDA, São Paulo - Brasil

*** Fosfato complexo de tetraciclina – Bristol-Meyer Squibb, São Paulo - Brasil.

Quadro 1 - Formulação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores ósseos fluorocromáticos

2.4.3 Segunda etapa cirúrgica

Os animais foram divididos em 3 grupos de 6 cães, os quais foram avaliados 2, 4 e 6 meses após a primeira intervenção cirúrgica. Os detalhes dos procedimentos pré, trans e pós-cirúrgico foram os mesmos executados na primeira etapa cirúrgica, uma vez que os animais não foram sacrificados e se mantiveram no Biotério Central da UFSC, para serem usados, após a completa recuperação do ato cirúrgico, na reprodução (FIG. 3). As amostras foram removidas, com o fim de se envolver sempre o tecido ósseo novo, o parafuso de osso bovino e o osso remanescente do cão. As biópsias foram devidamente armazenadas em recipientes próprios e embebidas em formol a 10% para posterior processamento histológico.



Figura 3 – Segunda etapa cirúrgica: observar os parafusos de osso recobertos por membrana (volume maior) e parafusos de osso sem membrana, indicados pela sonda milimetrada

2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a preparação de cortes finos para diagnóstico histológico por transiluminação, foram utilizados as Máquinas e acessórios do Sistema EXAKT (EXAKT Technologies, Inc. OK – USA), de corte por desgaste e de micro-desgaste, que permite a avaliação da interface intacta.

Após a fixação, a amostra foi preparada até se obter uma porção tecidual de 2mm a 4mm de espessura. O espécime foi então lavado em água corrente, por 2h, para eliminação do fixador. Passou-se à fase da desidratação, obtida através de soluções de álcool etílico,

gradualmente, da concentração de 60° GL até o álcool absoluto, com tempo de 3 dias para cada concentração, sob agitação constante.

A etapa seguinte foi a infiltração plástica, realizada com uma sequência de concentrações de glicometacrilato, terminando com 2 infiltrações de glicometacrilato puro. Cada infiltração durou 3 dias, sob agitação constante. A seguir, os espécimes infiltrados foram colocados em moldes apropriados para inclusão e foi realizada a sequência preconizada pelo sistema EXAKT (EXAKT-Technologies, Inc. OK – USA).

2.5.1 Análise histológica qualitativa em HE

As lâminas processadas pela técnica da hematoxilina e eosina foram interpretadas quanto à sua morfologia, sendo descritos os componentes celulares que se apresentavam em cada espécime.

2.5.2 Análise histológica no microscópio de fluorescência

Após a divisão dos experimentos em grupos, foram criados escores de acordo com a presença dos marcadores ósseos fluorocromáticos na parte do osso do cão, no parafuso de osso bovino ou em ambos. Uma vez que a área analisada já constava como sendo a interface entre o osso do cão e o parafuso de osso bovino, optou-se por considerar o aparecimento de fluorescência em qualquer uma dessas duas superfícies como sendo equivalente. Os marcadores ósseos indicavam, através de uma coloração fluorescente específica, uma atividade neoformadora de osso no exato momento em que foram aplicados. Assim, o pior

escore foi determinado quando nenhuma fluorescência era vista na lâmina (escore zero) e o melhor escore foi determinado quando os três tipos de fluorescência eram observados nas duas superfícies (escore dez). Obtidos os dados da microscopia, realizou-se um teste de Kruskal-Wallis para a obtenção de um resultado estatístico.

Os três marcadores foram observados sob microscopia de fluorescência em um microscópio OLYMPUS BX-40 FLA (NY - USA). As colorações correspondentes para cada um dos marcadores foram: vermelho para a Alizarina, verde para Calceína e amarelo-laranja para a tetraciclina. Uma vez selecionada a área, essa região foi fotografada com uma câmera digital que estava acoplada ao microscópio de. As fotografias das lâminas foram então analisadas, por um único examinador “cego” e devidamente calibrado, quanto à presença ou não dos marcadores ósseos para fluorescência. De cada experimento foi obtida uma única lâmina para a análise. Os animais foram então divididos em grupos, conforme o período de observação e o experimento realizado:

- grupo I - Parafusos de osso recobertos por membrana (análise de 2 meses);
- grupo II - Parafusos de osso recobertos por membrana (análise de 4 meses);
- grupo III - Parafusos de osso recobertos por membrana (análise de 6 meses);
- grupo IV - Parafusos de osso sem membrana (análise de 2 meses);
- grupo V - Parafusos de osso sem membrana (análise de 4 meses);
- grupo VI - Parafusos de osso sem membrana (análise de 6 meses).

O QUADRO 2 evidencia os escores utilizados.

ESCORES	FLUORESCÊNCIA
0	Sem fluorescência
1	Fluorescência laranja em uma superfície
2	Fluorescência laranja em duas superfícies
3	Fluorescência verde em uma superfície
4	Fluorescência verde em duas superfícies
5	Fluorescência vermelha em uma superfície
6	Fluorescência vermelha em duas superfícies
7	Duas fluorescências em uma superfície
8	Duas fluorescências em duas superfícies
9	Três fluorescências em uma superfície
10	Três fluorescências em duas superfícies

QUADRO 2 - Escores utilizados na análise estatística

2.6 ANÁLISE CLÍNICA

Ao serem reabertas, as áreas operadas mostraram um grande aumento vertical, que foi mensurado através de um paquímetro, com o objetivo de se analisar o aumento de volume ósseo. As medidas foram levadas em consideração somente quando havia um volume tridimensional uniforme para se medir a altura da base da tíbia até o fim do ganho de tecido ósseo, que seria equivalente em todos os planos. Como no experimento em que só colocamos parafusos de osso bovino, sem a cobertura de membrana, não houve essa equivalência (FIG. 4), optou-se por considerar apenas as medidas do experimento em que parafusos de osso bovino foram recobertos por membrana (FIG. 5).

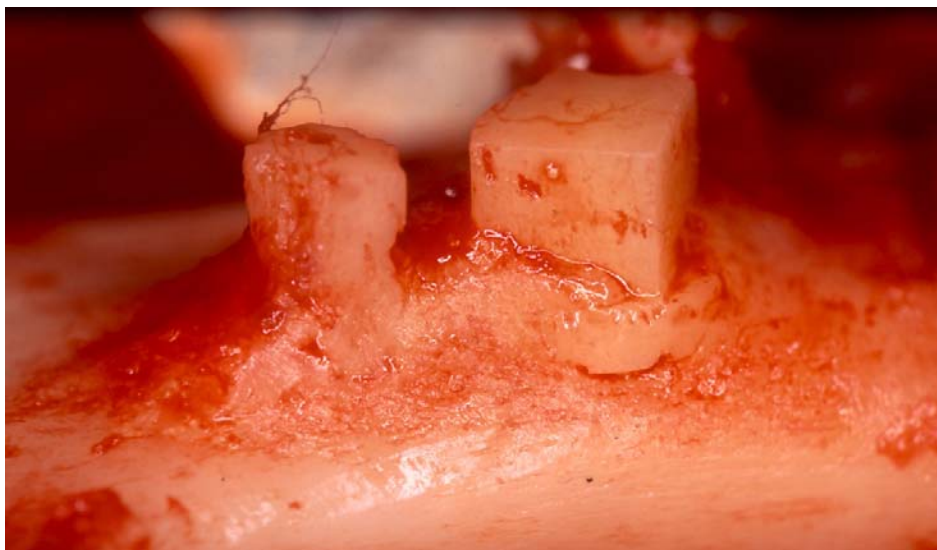


Figura 4 - Ausência de volume tridimensional uniforme para avaliação macroscópica do grupo dos parafusos sem membrana: observar os parafusos já em processo de reabsorção, após 4 meses e em contato íntimo com o osso neoformado



Figura 5 - Medida da altura do ganho ósseo no grupo dos parafusos recobertos com membrana: observar a presença volumosa de tecido ósseo em neoformação ao redor dos parafusos, após 4 meses.

3 RESULTADOS

3.1 RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA EM HE

Os cortes microscópicos mostraram-se semelhantes, tanto nos parafusos isolados como nos parafusos recobertos por membrana. Ambos revelaram uma sutil interface entre o osso bovino e osso neoformado, com ausência de tecido necrótico e de tecido conjuntivo entre os dois ossos. O tecido ósseo neoformado apresentou-se em continuidade direta com o osso bovino. Os tecidos ósseos apresentaram osteócitos e espaços medulares com padrões de normalidade. Observou-se, no osso neoformado em relação ao osso bovino, uma maior quantidade de estruturas tipo espaços medulares, bem como espaços medulares com maior diâmetro. Analisando-se os diversos períodos de observação, constatou-se que após 2 meses já podia ser observada uma maior organização do tecido ósseo neoformado. As FIG. 6, 7, 10 e 11 mostram as lâminas em HE de 2 espécimes e as FIG. 8, 9, 12 e 13 mostram essas mesmas lâminas vistas em um microscópio de fluorescência.

3.2 RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA POR FLUORESCÊNCIA

A TAB. 1 mostra os resultados de cada grupo quanto à fluorescência e as FIG. 8, 9, 12 e 13 mostram as fluorescências relativas às imagens em HE.

Tabela 1: Resultado dos grupos

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI
8	8	7	8	8	4
8	8	8	8	8	7
8	8	7	8	8	8
8	8	7	8	8	8
0	8	---	8	7	---
7	---	---	8	8	---

T = 9,58 e P= 0,0880. Não houve diferença estatística quanto à presença de fluorescência nos grupos.

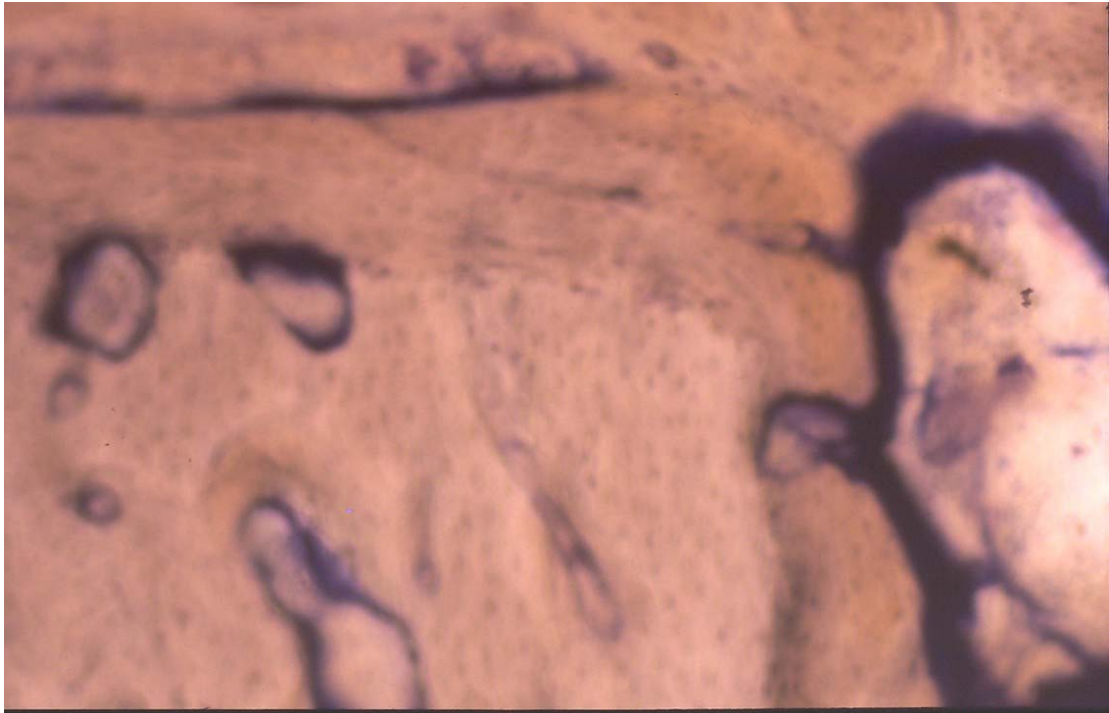


Figura. 6 e 7 - HE do grupo dos parafusos de osso com membrana, após 2 meses. Observar a união dos dois tipos ósseos, com a presença de osteócitos e espaços medulares.

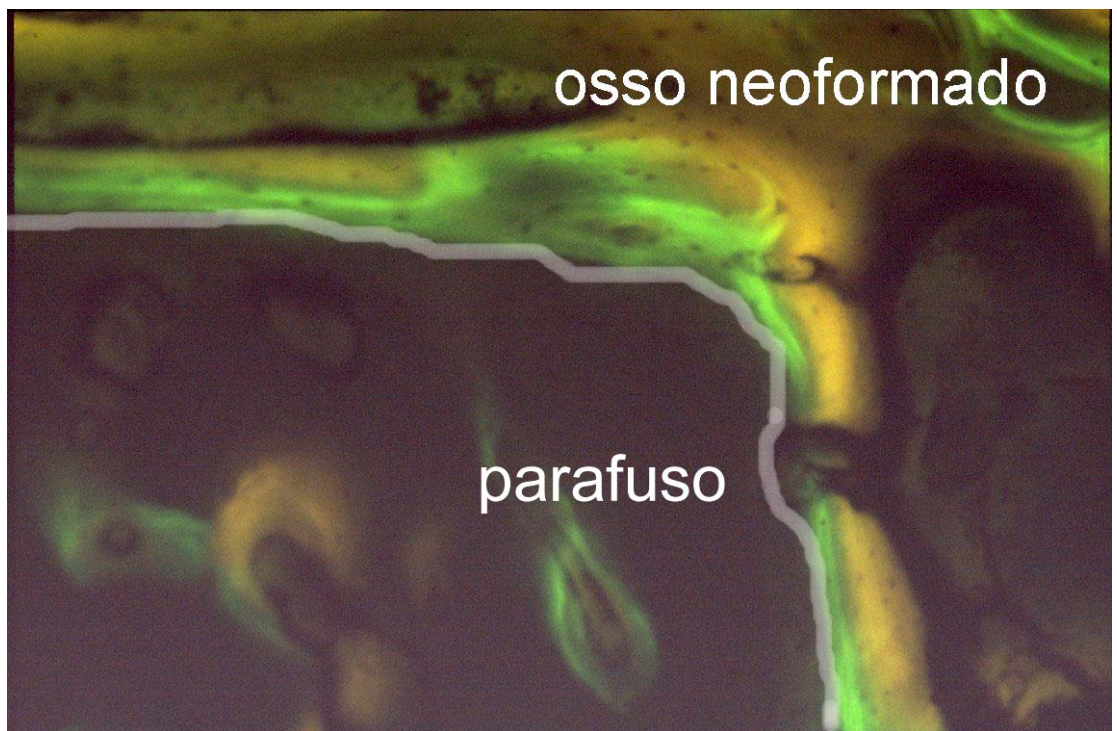
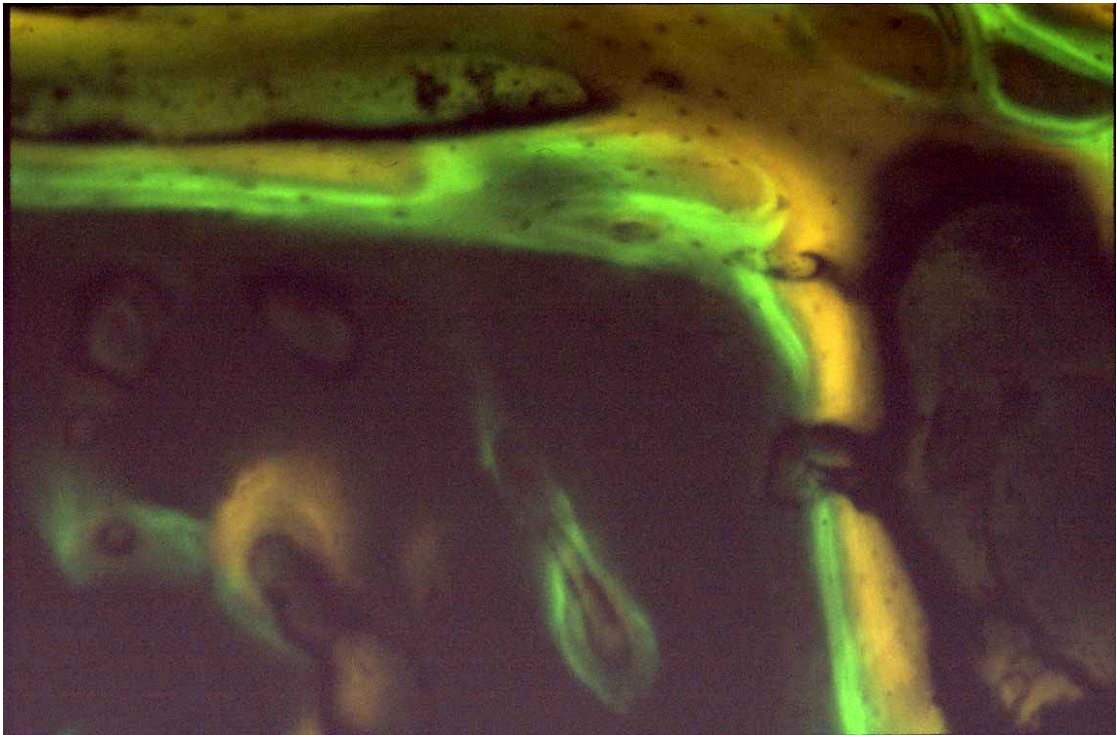


Figura. 8 e 9 - Grupo dos parafusos de osso com membrana após 2 meses. Presença de 2 marcadores fluorocromáticos (tetraciclina laranja e calceína verde), tanto na superfície do osso neoformado como no parafuso de osso.



Figura 10 e 11 - HE do grupo dos parafusos de osso com membrana após 4 meses. Observar a organização do tecido ósseo neoformado em íntimo contato com o osso do parafuso.

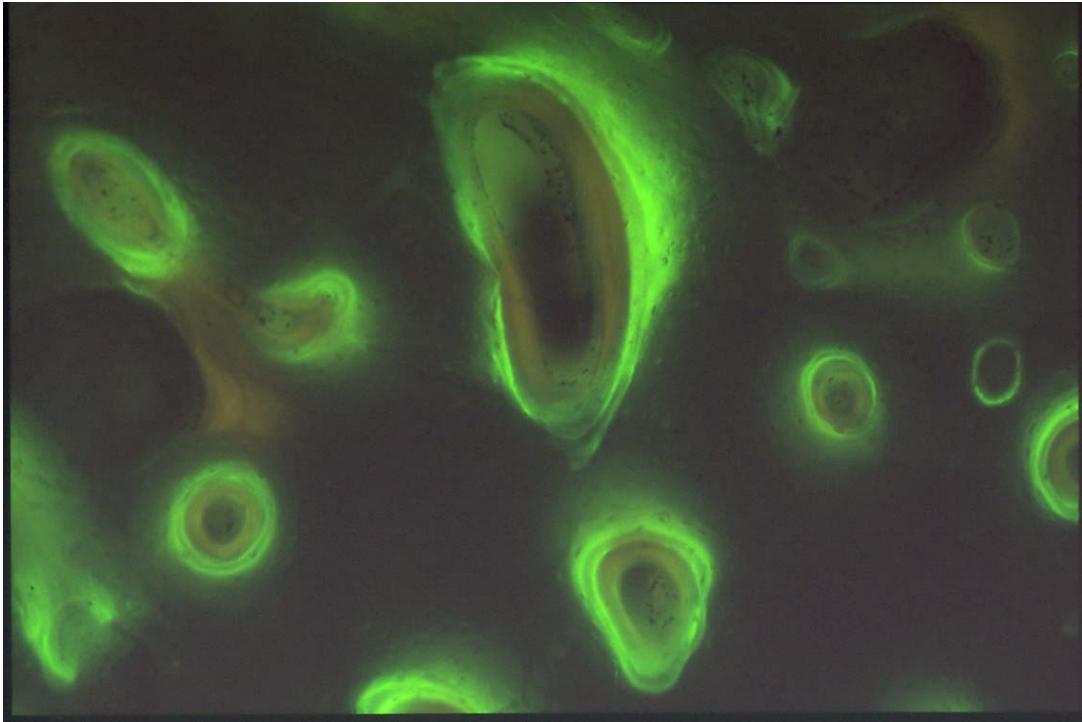


Figura12 e 13 - Grupo dos parafusos de osso sem membrana após 4 meses. Presença dos marcadores fluorocromáticos (tetraciclina laranja e calceína verde), nas duas superfícies. Observar a dificuldade de identificação da interface

Devido à perda de animais, houve um reduzido número de observações no experimento. Visto que cada animal representava duas observações, a perda de 3 cães resultou na diminuição de 6 observações. Sendo assim, executou-se uma simulação estatística, dobrando o número das amostras. Isso evitou a utilização de mais animais na pesquisa. Na simulação, obtiveram-se novos resultados, que indicaram uma diferença estatística entre os grupos (TAB. 2).

Tabela 2: Simulação dos resultados dos grupos

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI
8	8	7	8	8	4
8	8	8	8	8	7
8	8	7	8	8	8
8	8	7	8	8	8
0	8	---	8	7	---
7	---	---	8	8	---
8	8	7	---	8	4
8	8	8	8	8	7
8	8	7	8	8	8
8	8	7	8	8	8
0	8	---	8	7	---
7	---	---	---	8	---

T = 19,18 e P = 0,0018

Grupo II

Grupo IV

Grupo V

Grupo I

Grupo VI

Grupo III

De acordo com os dados obtidos na simulação dos resultados, constatou-se que:

- o grupo III (parafusos de osso recobertos por membrana analisados após 6 meses) tem menos fluorescência do que o grupo II (parafusos de osso recobertos por membrana analisados após 4 meses);
- o grupo II (parafusos de osso recobertos por membrana analisados após 4 meses) é equivalente ao grupo I. (parafusos de osso recobertos por membrana analisados após 2 meses);
- os grupos IV, V e VI (parafusos de osso sem membrana analisados após 2, 4 e 6 meses, respectivamente) têm o mesmo nível de fluorescência.

3.3 RESULTADOS DA ANÁLISE CLÍNICA

Nos 3 períodos de observação, a quantidade média de aumento de altura óssea que se obteve no experimento em que se cobriram os parafusos de osso bovino com membrana foi de 5,15mm. A TAB. 3 mostra as medidas obtidas dos espécimes.

TABELA 3 - Altura do tecido ósseo, medida em milímetros, dos grupos de parafusos
ósseos recobertos por membrana

ALTURA ÓSSEA APÓS 2 MESES	ALTURA ÓSSEA APÓS 4 MESES	ALTURA ÓSSEA APÓS 6 MESES
5,0 mm	5,27 mm	5,0 mm
5,81 mm	5,0 mm	4,71 mm
5,92 mm	5,33 mm	4,55 mm
5,28 mm	5,92 mm	4,55 mm
5,39 mm	---	4,53 mm

4 DISCUSSÃO

Para evitar as desvantagens dos enxertos ósseos autógenos como: a necessidade de uma área doadora que gere duas áreas cirúrgicas, aumento da morbidade do procedimento, possibilidade de presença de cicatriz com possíveis deformidades na área doadora e dificuldade de se obter grandes quantidades de tecido^{37,38}, houve um aumento no número de “enxertos” alógenos e xenógenos². Tais técnicas reconstrutivas são previsíveis, principalmente quando relacionadas com o aumento ósseo horizontal. Todavia, o crescimento vertical em grande escala ainda é de difícil obtenção, independente da técnica a ser utilizada.

A partir dessas considerações, percebe-se que o uso dos parafusos de osso bovino usinados pode representar uma alternativa interessante como material de preenchimento em atrofias ósseas^{1,31-34}. Através dos estudos, tornou-se possível constatar que a usinagem de parafusos ósseos provém de processos físicos, químicos e tecnológicos de natureza muito complexa. Os parafusos ósseos usinados a partir de osso cortical bovino apresentam um potencial osteocondutor, na medida em que se constituem em matriz física e absorvível. É possível afirmar que determinados processos biológicos, dentre eles a dinâmica óssea, são controlados através da influência recíproca de fatores mecânicos e biológicos, nos quais estímulos funcionais desencadeiam respostas, determinando o metabolismo do órgão ao qual esse estímulo foi dirigido. Como a regeneração óssea guiada utiliza membranas para exclusão tecidual, estabilização do coágulo e manutenção do espaço, com conseqüente preenchimento

ósseo, associar esse tipo de material aos parafusos de osso bovino pode aumentar a previsibilidade da técnica para ganhos ósseos de maior volume, pois a manutenção do espaço proporcionado pelo corpo dos parafusos evita o colapso da membrana, favorecendo uma maior formação óssea.

Iniciou-se a fabricação de implantes ortopédicos a partir da usinagem de osso humano³¹. Seu trabalho foi precursor no desenvolvimento das técnicas e ferramentas usadas na usinagem de peças ósseas. Esse trabalho pioneiro utilizou o osso cortical humano na usinagem de parafusos. Ocorre que o osso cortical bovino, principalmente da região da tíbia e do fêmur, apresenta propriedades estruturais superiores ao humano³⁹. Embora não apresentem a mesma resistência dos parafusos metálicos, os elaborados em osso podem concorrer com eles e com os polímeros, em procedimentos como a fixação de fraturas em regiões anatômicas onde as cargas sobre os parafusos não são elevadas. No entanto, haveria a necessidade da realização de novas pesquisas que avaliassem outras propriedades físicas do parafuso de osso, tal como sua resistência ao cisalhamento, que poderia ser considerada no futuro em uma próxima pesquisa³¹.

Dando seqüência aos estudos, procurou-se encontrar um material que eliminasse qualquer possibilidade de transmissão de doenças e ainda mantivesse a capacidade de formação óssea. Foi desenvolvido¹ parafusos usinados em osso cortical bovino desproteinizado, realizando testes mecânicos de resistência. Seu estudo teve o objetivo de desenvolver um parafuso com utilidades mais direcionadas com as necessidades da área odontológica; o autor conduziu seu trabalho de modo a que auxiliasse nas cirurgias corretivas ósseas. Os resultados sugeriram que esse material pode ser classificado como biomaterial com características osseocondutoras, na medida em que se constitui em matriz física e absorvível, propriedades facilitadoras na recuperação de áreas ósseas perdidas¹. Após esses primeiros testes mecânicos, surgiu a possibilidade de se realizar um estudo clínico histológico em

animais³². Desenvolveu-se então uma análise microscópica do comportamento tecidual de parafusos de osso bovino instalados em tíbia de coelho, utilizando o parafuso desenvolvido por Salles¹. Esse trabalho mostra o comportamento histológico da osteocondução do osso bovino, comprovando sua viabilidade clínica. O autor observou que as visões macroscópicas dos espécimes demonstraram evidente crescimento ósseo vertical associado aos sítios experimentais dos coelhos. Todas as peças apresentaram a cabeça do parafuso completamente liberada de seu corpo³². No presente estudo, também observamos esse crescimento vertical na grande maioria dos espécimes, principalmente naqueles recobertos pelas membranas. Entretanto, nenhum espécime apresentou a cabeça solta do corpo no grupo em que os parafusos de osso foram recobertos por membrana. Já no grupo cujos parafusos ósseos não foram recobertos por membrana, ocorreu o destravamento de alguns parafusos na sua totalidade e, em 3 espécimes, o desprendimento isolado da cabeça. Acredita-se que o desprendimento isolado da cabeça do parafuso pode ser fruto da reabsorção deste, contudo, a membrana, através da sua característica de arcabouço rígido, acabou oferecendo uma proteção natural, evitando o deslocamento dos parafusos.

Posteriormente, foi estudada a otimização da geometria e avaliação da resistência à torção de parafusos de osso cortical bovino³⁴. A macroestrutura anteriormente desenvolvida¹ e que foi usada, *in vivo*³², apresentou como deficiência uma suscetibilidade à fratura. Para melhorar a geometria dos parafusos de osso e também aumentar a sua resistência à fratura, o autor modificou a macro estrutura dos parafusos³⁴. Pelos resultados obtidos, o autor sugeriu que os parafusos de osso bovino poderiam ser utilizados em pesquisas, *in vivo*, já que sua resistência ao aparafusamento manual foi comprovada. Foi esse desenho o adotado no presente estudo. Também através desse trabalho³⁴ concluiu-se que os parafusos deveriam ser rehidratados antes da utilização clínica, pois o processo de liofilização interfere nas propriedades mecânicas do osso tratado, reduzindo o módulo de elasticidade, a deformação e

energia de ruptura. Uma forma de amenizar esses empecilhos é a utilização de técnicas de rehidratação³⁹. Esses experimentos demonstraram que o osso cortical bovino, depois de liofilizado, foi reidratado em solução salina por 2h a temperatura de 20°C, recuperando parcialmente suas características³⁹. A utilização dessa técnica reduziu sensivelmente a fratura dos parafusos de osso durante os procedimentos cirúrgicos ou de sua inserção na tíbia de cães, realizada no presente estudo.

As análises histológicas realizadas em microscópio óptico (com aumento final de 250 vezes), no trabalho de Schiochett³², demonstraram reabsorção completa dos parafusos, com substituição por tecido ósseo normal, sem áreas necróticas e de reabsorção acentuada. A presença abundante de osteócitos caracterizou o tecido ósseo em neo-formação. Essas observações também foram verificadas no presente estudo, tanto no grupo dos parafusos isolados como no grupo dos parafusos recobertos por membrana. Ainda no estudo desta³², em algumas amostras observou-se grande crescimento ósseo a partir do perióstio remanescente. Esse fato sugere que a presença física do parafuso pode criar e manter um espaço subjacente ao perióstio, que pode ser preenchido por tecido ósseo oriundo deste. Constatou-se, ainda, em todos os espécimes, ausência de células inflamatórias e de fibrose. Essas observações também ocorreram no presente estudo, no grupo dos parafusos sem membrana. Nos espécimes onde os parafusos, apesar dos traumas provocados pelos animais, ainda permaneceram no local, conseguiu-se observar um crescimento vertical significativo, provavelmente oriundo de células do endóstio e do perióstio, pois não havia o isolamento proporcionado pelas membranas. Por conseguinte, no grupo dos parafusos recobertos por membrana houve uma formação mais uniforme, tanto que se conseguiu mensurar esse ganho ósseo. Contudo, o osso que estava adjacente aos parafusos sem membrana pareceu ser menos resiliente do que o osso adjacente aos parafusos recobertos por membrana. Isso pode ser explicado pela presença de duas fontes produtoras de osso: o endóstio e o perióstio, o que não ocorre quando os

parafusos são recobertos por membrana, pois esta isola o periósteo do meio, talvez desacelerando a velocidade de neoformação óssea. Dessa forma, pode-se suspeitar que, se os parafusos forem mantidos em posição, estes terão um ganho substancial em altura óssea sem a necessidade do uso de membranas. Entretanto, o procedimento de manter os parafusos em posição sem o uso das membranas parece inviável e tornou-se um desafio para os próximos estudos na mesma linha de pesquisa. É importante salientar que no grupo em que foram usadas as membranas para recobrir os parafusos, o ganho macroscópico foi maior e mais uniforme, aumentando a previsibilidade do aumento ósseo, porém, as características histológicas de ambos os grupos foram bastante semelhantes, gerando a necessidade de outros estudos que mantenham os parafusos sem membrana em posição, para que se comprovem essas suspeitas.

A utilização de membranas reforçadas com titânio, fixadas por pequenos parafusos metálicos, para a cobertura dos parafusos de osso bovino foi uma alternativa escolhida para aumentar o volume de ganho ósseo no presente estudo. A idéia era associar os princípios da ROG com os parafusos de osso bovino. Os resultados obtidos vieram ao encontro de outros achados^{40,41}, que observaram que o novo suprimento vascular provém das perfurações criadas cirurgicamente na cortical óssea. Tais perfurações também foram executadas no presente estudo, ao redor e entre os parafusos de osso. A escolha das membranas reforçadas com titânio também demonstrou resultados semelhantes em outros estudos^{21-30,42}, o que demonstra sua capacidade de resistência ao colapso (manutenção do espaço), permanecendo em função, como barreira, por um período extenso de tempo.

O volume de ganho obtido no presente estudo confirmou as observações feitas por outros autores^{21-30,42}. Estes entenderam que a formação de osso acima da crista é mais previsível se usada uma membrana reforçada com titânio e material de preenchimento, de preferência osso autógeno. No presente estudo não se utilizou osso autógeno, contudo

demonstrou-se que a associação dos parafusos ósseos com a ROG teve resultados clínicos de aumento vertical superiores aos obtidos nos estudos anteriores. Além disso, esses estudos avaliaram o crescimento vertical geralmente associado a implantes, prevendo ganho ósseo em apenas um sentido, enquanto no presente estudo esse ganho partiu da cortical óssea pré-existente da tíbia dos animais, obtendo um aumento ósseo tridimensional. Embora a diferença da média de altura óssea obtida após 2, 4 e 6 meses de avaliação tenha sido discreta, constatou-se que os dados macroscópicos comprovaram os achados histológicos. Observando que aos 6 meses conseguiu-se uma ligeira redução no ganho da altura óssea, conclui-se que nessa fase o processo de reabsorção é muito maior, fazendo com que ocorra uma diminuição do volume do enxerto, o que reafirma a posição obtida na análise histológica por fluorescência de que não são necessários 6 meses para se considerar o enxerto em condições de uso nos grupos em que foram recobertos os parafusos de osso com membrana. A explicação para essa diferença estaria na capacidade dos parafusos de osso bovino de manterem o arcabouço das membranas por mais tempo.

O aumento vertical pode também ser obtido através da distração osteogênica. Trata-se de processo biológico de formação de novo osso entre os segmentos ósseos gradualmente separados pela tração incremental. A tensão gerada ao “calo” ósseo estimula a osteogênese e proporciona correção simultânea de tecidos duro e mole⁴³. Porém, as dificuldades dessa técnica, como: necessidade do aparelho distrator, risco de infecção e, ainda, altura óssea mínima de 6mm para confecção da corticotomia e instalação do aparelho no segmento e remanescente ósseo, dificultam a sua aplicação como um procedimento de rotina. As principais vantagens, que seriam a ausência do sítio doador e o grande aumento ósseo vertical, também foram obtidas no presente estudo.

A inexistência da visualização de um dos marcadores ósseos (alizarina) no presente estudo também ocorreu em outros trabalhos^{36,44} e pode ter acontecido devido à ação desse

marcador ósseo como interferente na mineralização óssea. Todavia, demonstrou-se que a tetraciclina tem uma tendência a misturar-se ou ser mascarada pelo marcador verde (calceína) devido à sua fraca fluorescência e baixa visibilidade⁴⁵, fato esse igualmente ocorrido no presente estudo. Para minimizar esse problema, utilizou-se a dupla aplicação dos marcadores, conforme preconizado em outros estudos^{36,44}. Isso pode ter diminuído, mas não eliminado totalmente o problema.

A maior deposição de tecido ósseo nas fases de aplicação do marcador calceína pode também ser explicada pela presença da hidroxiapatita, que é considerada bioativa por vários trabalhos científicos⁴⁶⁻⁴⁸, promovendo uma forte união com o tecido ósseo, através da presença de grandes quantidades de íons de Ca oriundos do meio extracelular, aumentando o pH total e diminuindo a ação do processo inflamatório inicial, através da redução da fluidez da membrana celular.

Por outro lado, vários autores^{36,44,49,50} observaram que a prevalência do marcador calceína (verde) em detrimento dos outros dois marcadores pode ter ocorrido em função do quadro inflamatório inicial, impossibilitando que as células ósseas pudessem secretar maior quantidade de matriz orgânica óssea nos períodos iniciais do reparo. O tecido ósseo primário formado logo após o trauma cirúrgico é rapidamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo secundário que, após certo período, remodela-se em tecido cortical maduro. Sendo assim, o marcador alizarina (vermelho) administrado no período inicial de reparação é reabsorvido, em parte para dar lugar à calceína, depositada em maior quantidade. Essas conclusões podem ser extrapoladas e explicar parte dos fenômenos semelhantes ocorridos no presente estudo.

A constatação da reabsorção do parafuso de osso bovino com conseqüente preenchimento ósseo (comprovada pela presença de marcadores fluorocromáticos sobre o

parafuso), a obtenção de ganho ósseo vertical considerável na totalidade das peças experimentais, a presença de tecido ósseo em neo-formação e a ausência de osso necrótico, células inflamatórias e fibrose confirmam os resultados de trabalhos anteriores^{32,34} e sugerem que os parafusos de osso bovino possam ser utilizados, em humanos, como substitutos de enxertos ósseos.

5 CONCLUSÕES

- a) A análise histológica pela técnica HE demonstrou a viabilidade do tecido ósseo neoformado através da presença de osteócitos, espaços medulares com padrões de normalidade e ausência de tecido fibroso e necrótico.
- b) Inexistiram diferenças estatísticas significantes, através dos escores adotados entre os parafusos de osso bovino, com ou sem membrana, quanto à presença de fluorescência e marcadores ósseos, demonstrando que esses dispositivos promovem um estímulo ao crescimento ósseo.
- c) Os resultados clínicos demonstraram um grande aumento vertical e uniforme no grupo onde os parafusos foram recobertos por membrana, sugerindo que o uso combinado dos parafusos de osso e membranas reforçadas com titânio aumenta a previsibilidade da osteopromoção.

REFERÊNCIAS

1. Salles BW. *Usinagem de parafuso de osso cortical bovino liofilizado* [dissertação]. Florianópolis(SC): Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
2. Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone replacement grafts: the bone substitutes. *Dent Clin North Am* 1998; 42:491-503.
3. Hämmerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9:151-162.
4. Ouhayoun JP. Bone grafts and biomaterials used as bone graft substitutes. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J. *Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology: chemicals in periodontics*. Berlim: Quintessenz, 1997:313-358.
5. Thaller SR, Hoyt J, Borjeson K, Dart A, Tesluk H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1994; 54:242-246.
6. Hürzeler MB, Quinomes CR, Kirsch A, Gloker C, Schupbach P, Strub JR, et al. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8:476-486.
7. Callan DP, Rohrer MD. Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. *J Periodontol* 1993; 64:575-582.
8. Fukuta K, Har-Shai Y, Collares MV, Lichten JB, Jackson IT. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full thickness skull defect. *J Craniofac Surg* 1992; 3:25-29.
9. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50:241-249.

10. Thaller SR, Hoyt J, Borjeson K, Dart A, Tesluk H. Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine mineral (Bio-Oss) in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1993; 4:79-84.
11. Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histologic study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1995; 6:155-163.
12. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8:117-124.
13. Hämmerle CH, Olah AJ, Schmidt J, Fluckiger L, Gogolewski S, Winkler JR, et al. The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8:198-207.
14. Schmid J, Hammerle CH, Fluckiger L, Winkler JR, Olah AJ, Gogolewski S, et al. Blood filled spaces with and without filler materials in guided bone regeneration. A comparative experimental study in the rabbit using bioresorbable membranes. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8:75-81.
15. Proussaefs P, Lozada J. The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25:351-363.
16. Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25:19-25.
17. Simion M, Fontana F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review. *Minerva Stomatol* 2004; 53:191-206.
18. Kostopoulos L, Lioubavina N, Karring T, Uraguchi R. Role of chitin beads in the formation of jaw bone by guided tissue regeneration. An experiment in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12:325-331.
19. Klokkevold PR, Jovanovic AS. Advanced implant surgery and bone grafting techniques. In: Newman MG, Takei H, Carranza Jr FA. *Carranza Clinical Periodontology*. Philadelphia: W. B. Saunders, 2002:806-819.
20. Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15:315-324.
21. Jovanovic SA, Nevins M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995; 15: 56-69.

22. Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1994;5:75-82.
23. Cortellini P, Tonetti MS. Clinical performance of a regenerative strategy for intrabony defects: scientific evidence and clinical experience. *J Periodontol* 2005; 76:341-350.
24. Simion M, Tristi P, Piatelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994; 14:496-511.
25. Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54: 420-433.
26. Tinti C, Parma-Benfenati S, Polizzi G Vertical ridge augmentation: what is the limit? *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1996; 16:220-229.
27. Tinti C, Parma-Benfenati S. Vertical ridge augmentation: surgical protocol and retrospective evaluation of 48 consecutively inserted implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998; 18:434-443.
28. Simion M, Jovanovic AS, Tinti C, Benfenati SP. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12:35-45.
29. Parma-Benfenati S, Tinti C, Albrektsson T, Johansson C. Histologic evaluation of guided vertical ridge augmentation around implants in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999; 19:424-437.
30. Buser D, Ingimarsson S, Dula K, Lussi A, Hirt HP, Belser UC. Long-term stability of osseointegrated implants in augmented bone: a 5-year prospective study in partially edentulous patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22:109-117.
31. Mora FAR. *Fabricação de implantes ortopédicos a partir de usinagem de osso humano* [tese]. Florianópolis (SC): Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
32. Schiochett C. *Análise microscópica do comportamento tecidual de parafusos de osso bovino instalados em tibia de coelho* [dissertação]. Florianópolis(SC): Programa de Pós-Graduação em Odontologia , Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
33. Bento DA. *Análise de resistência mecânica em implantes de osso - um enfoque numérico e experimental* [dissertação]. Florianópolis (SC):Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina,2003.

34. Oliveira OMR. *Otimização da macrogeometria e avaliação da resistência à torção de parafusos de osso cortical bovino desproteinizado* [dissertação]. Florianópolis(SC): Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
35. Haas R, Donath K, Fodinger M, Watzek G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9:107-116.
36. Allegrini Júnior S. Atuação da proteína morfogenética óssea bovina ou complexo vitamínico, associados a hidroxiapatita natural, no processo de osteointegração em diferentes superfícies de implantes de titânio [tese]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo, 2003.
37. Nary Filho H, Ilg JP. Atrofia severa da maxila. In: Dinato JC, Polido WD. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas, 2001:343-372.
38. Matsumoto MA, Filho HN, Francischone E, Consolaro A. Microscopic analysis of reconstructed maxillary alveolar ridges using autogenous bone grafts from the chin and iliac crest. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:507-516.
39. Cowin SC. *Bone mechanics handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001.
40. Shenk RK, Buser D, Hardwick RW, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane protected defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9:13-29.
41. Carpio L, Loza J, Lynch S, Genco R. Guided bone regeneration around endosseous implants with anorganic bovine bone mineral a randomized controlled trial comparing bioabsorbable versus non-resorbable barriers. *J Periodontol* 2000; 71:1743-1749.
42. Jovanovic SA, Shenk RK, Orsini M, Kenney EB. Supracrestal bone formation around dental implants: An experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; 10:23-31.
43. Pinto AVS, Miyagusko JM, Soares MM, Joazeiro PP, Yamada AT, Pereira LAVO. Distração osteogênica. In: Dinato JC, Polido WD. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas, 2001:397- 421.
44. Beck JT. *Avaliação da interface implante/osso de implantes de uso odontológico em túbias de coelhos* [tese]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1997.
45. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown T, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information?. *Bone* 1992; 13:443-446.
46. de Groot K, Geesink R, Klein CP, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res* 1987; 21:1375-1381.

47. Lorenzetti M, Mozzati M, Campanino PP, Valente G. Bone augmentation of the inferior floor the maxillary sinus with autogenous bone or composite bone grafts: a histologic-histomorphometric preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13:69-76.
48. Zendron MV. Estudo da formação óssea vertical em torno de implantes osteointegrados obtida por um dispositivo de exclusão tecidual e modificada pelo emprego de osso autógeno, osso bovino inorgânico e vidro bioativo. Análise morfométrica em cães [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2001.
49. König Júnior B, Beck TJ, Kappert HF, Kappert CC, Masuko TS. A study of different calcification areas in newly formed bone 8 weeks after insertion of dental implants in rabbit tibias. *Ann Anat* 1998; 180:471-475.
50. Lopes CC. *Implantes osteointegrados usados em odontologia. Sistema "lifecore". Um estudo estrutural e ultraestrutural* [dissertação]. São Paulo(SP): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1999.

B577o Bianchini, Marco Aurélio

Osteopromocão através do uso combinado de parafusos de osso bovino e membranas reforçadas com titânio. Análises clínica e histológica. / Marco Aurélio Bianchini; orientador Ricardo de Souza Magini. - Florianópolis, 2006.

XX f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Opção Implantodontia.

Inclui bibliografia.

1. Parafusos ósseos. 2. Regeneração óssea. 3. Implantes dentários. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-089.843